

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
21 novembre 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/092632 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 16/06, 1/18, 1/36, 1/30

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01407

(22) Date de dépôt international : 24 avril 2002 (24.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/06234 11 mai 2001 (11.05.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LABO-  
RATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET  
DES BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; Zone d'Activité  
de Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis  
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CH-  
TOUROU, Abdessatar, Sami [FR/FR]; 20, avenue du  
Château, F-78990 Elancourt (FR). PAOLANTONACCI,  
Philippe [FR/FR]; 7, résidence les Fonds Fanettes,  
F-91190 Gif sur Yvette (FR). SCHMITTHAEUSLER,  
Roland [FR/FR]; 44, rue Louis de Funès, F-78180 Mon-  
tigny le Bretonneux (FR). LIROCHON, Jacky [FR/FR];  
7, rue des Vignes, F-91650 Breuillet (FR).

(74) Mandataire : LEPEUDRY-GAUTHERAT, Thérèse;  
Cabinet Lepeudry, 43, rue de la Brèche aux Loups,  
F-75012 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING HUMAN IMMUNOGLOBULIN CONCENTRATES FOR THERAPEUTIC USE

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE CONCENTRES D'IMMUNOGLOBULINES HUMAINES A USAGE THERA-  
PEUTIQUE

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing human immunoglobulin concentrates for therapeutic use, from plasma  
or a plasma fraction. The method comprises pre-purification and a single anion-exchange chromatography carried out at alkaline  
pH, thereby enabling the immunoglobulins to be retained on the chromatographic support and fractionated. The method enables to  
obtain IgG, IgA and IgM concentrates.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique,  
à partir de plasma ou d'une fraction de plasma. Le procédé comprend une prépurification et une chromatographie unique sur échan-  
geur d'anions effectuée à pH alcalin, ce qui permet la rétention des immunoglobulines sur le support chromatographique et leur  
fractionnement. Le procédé permet d'obtenir des concentrés d'immunoglobulines G, A et M.



WO 02/092632 A1

Procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique

L'invention concerne un procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique, à partir de plasma ou d'une fraction de plasma humain. Le procédé permet d'obtenir des concentrés  
5 d'immunoglobulines G (IgG), d'immunoglobulines A (IgA) et d'immunoglobulines M (IgM).

L'utilisation de fractions de plasma humain enrichies en immunoglobulines pour le traitement de diverses infections ou déficiences congénitales est connue depuis la  
10 mise au point du procédé de précipitation à l'éthanol par Cohn (Cohn et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459 ; Oncley et al. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541). Les indications thérapeutiques des immunoglobulines s'étant multipliées, il existe un besoin de produit toujours plus performant et plus  
15 pur.

La complexité de la structure des immunoglobulines (quatre chaînes polypeptidiques réunies par des ponts disulfure), la variété des anticorps présents dans le mélange du plasma de plusieurs milliers de donneurs ne sont  
20 pas actuellement des facteurs favorisant le développement biotechnologique des immunoglobulines. Bien que des anticorps monoclonaux soient produits par ingénierie génétique, leur extrême spécificité constitue un inconvénient pour les applications thérapeutiques où une  
25 polyréactivité semble nécessaire.

De plus, de nombreuses pathologies, en particulier d'origine autoimmune, sont actuellement traitées par des concentrés d'IgG. Cette large utilisation a engendré une situation de pénurie en Europe et aux Etats-Unis, au cours  
30 des dernières années.

Par ailleurs, dans ces mêmes pathologies, l'efficacité de préparations enrichies en IgM a été récemment démontrée. (Hurez et al. Blood 90, 1997, 4004-4013), mais il n'existe pas de préparation à usage thérapeutique suffisamment  
35 purifiée et concentrée en IgM.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est attachée à la

mise au point d'un nouveau procédé de préparation d'immunoglobulines humaines. Le procédé peut s'appliquer à un "pool" de sérums (d'au moins 10000 donneurs) ce qui assure la présence de tous les anticorps normalement  
5 présents dans l'ensemble de la population d'une contrée choisie, ou à des sérums hyperimmuns sélectionnés pour leur contenu en immunoglobulines spécifiques. Le procédé permet en outre de préparer des concentrés d'IgA et d'IgM.

De nombreuses variantes du procédé original de Cohn  
10 ont été décrites. Elles proposent, outre la précipitation sélective des protéines à l'éthanol, divers traitements additionnels comme la précipitation au polyéthylène glycol, le traitement ménagé aux enzymes protéolytiques..., destinés à éliminer les agrégats de polymères d'immunoglobulines  
15 (susceptibles d'activer le système du complément et de provoquer des réactions anaphylactiques).

Une voie alternative à la précipitation par l'éthanol a été décrite par Steinbuch et al. (Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 1969, XIV, 1054) qui fait appel à une précipitation  
20 par l'acide octanoïque. Celui-ci précipite la plupart des protéines du plasma et laisse dans le surnageant les immunoglobulines. La purification de ces immunoglobulines est poursuivie par adsorption (en "batch") sur un échangeur d'anions, la DEAE-cellulose, qui laisse également les  
25 immunoglobulines dans le surnageant. Celui-ci est ensuite concentré.

Divers procédés ont également été mis au point pour augmenter la pureté des produits par la mise en oeuvre de séparations chromatographiques. Les plus performants  
30 (notamment EP 0 703 922, WO 99/64462) comprennent au moins deux étapes successives de chromatographie, l'une par échange d'anions, l'autre par échange de cations. La spécificité de ces procédés est apportée par la propriété des échangeurs d'anions de ne pas retenir les  
35 immunoglobulines G, dans les conditions classiques de mise en oeuvre, mais de fixer la plupart des autres protéines co-

purifiées au cours des étapes de prépurification.

Diverses préparations d'IgG purifiées sont donc déjà disponibles mais leurs procédés de préparation posent encore des problèmes de rendement et de lourdeur de mise en oeuvre  
5 à l'échelle industrielle. Ces problèmes sont encore amplifiés par la nécessité d'inclure dans le procédé une inactivation virale impliquant une étape additionnelle d'élimination des agents virucides utilisés.

De plus, l'ensemble des procédés actuellement décrits  
10 ont été développés et optimisés pour la production des seules IgG.

La Demanderesse a trouvé qu'il était possible de produire plusieurs concentrés d'immunoglobulines en combinant une étape de prépurification et une étape unique  
15 de chromatographie par échange d'ions et ainsi de mettre en oeuvre un procédé très simple, à haut rendement et compatible avec un traitement virucide au solvant/détergent.

Ainsi le procédé selon la présente invention est applicable à du plasma sanguin ou à une fraction de plasma  
20 sanguin déjà enrichie en immunoglobulines et il comprend une prépurification par précipitation de contaminants lipidiques et protéiques et une chromatographie unique sur échangeur d'anions, effectuée à pH alcalin ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines sur le support chromatographique  
25 échangeur d'anions.

La prépurification est effectuée au moyen d'agents précipitants connus tels que l'acide octanoïque, le phosphate tricalcique, la bentonite.

Après cette étape de prépurification et avant la  
30 chromatographie, le procédé comprend un traitement d'inactivation virale, de préférence par solvant-détergent, selon une méthode connue.

A la fin de ce traitement, le mélange du filtrat prépurifié et du solvant-détergent est soumis à une  
35 séparation chromatographique qui est effectuée sur un gel de polysaccharide réticulé ou de polymère vinylique, greffé de

groupements DEAE, TMAE ou QAE. Cette étape de chromatographie comprend

- l'ajustement à un pH de 8,9 à 9,1 de la solution ayant subi le traitement au solvant-détergent ;
- 5 - sa charge sur la colonne de chromatographie préalablement équilibrée en tampon à pH 8,9 à 9,1 ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines et le passage des protéines non adsorbées dans l'effluent ;
- un lavage par le même tampon jusqu'à élimination de toutes  
10 les protéines non adsorbées et du mélange solvant-détergent ;
- et l'élution des immunoglobulines par un tampon approprié.

Cette élution peut être réalisée soit par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, et de préférence à pH  
15 6,2 pour éluer les immunoglobulines G, soit de manière séquentielle :

- dans un premier temps comme ci-dessus pour éluer les immunoglobulines G ;
- dans un deuxième temps, par le même tampon phosphate  
20 additionné de NaCl 100 à 175 mM, et de préférence 150 mM, à un pH de 6,1 à 6,3, pour éluer une fraction contenant les IgA et des IgG4.

Le procédé peut être encore poursuivi par une nouvelle élution par le même tampon ajusté à un pH de 6 à 7 et  
25 additionné de NaCl 250 à 350 mM, de préférence 300 mM pour éluer les IgM.

Les immunoglobulines ainsi éluées sont récoltées, concentrées par ultrafiltration et soumises à une filtration stérilisante conventionnelle puis à une filtration au  
30 travers de filtres nanométriques de porosité décroissante de 100 à 50 et à 20 nanomètres. Cette nanofiltration permet d'éliminer des virus résistants au traitement par solvant-détergent :

La solution d'immunoglobulines concentrée et filtrée  
35 est additionnée d'un stabilisant pharmaceutiquement acceptable, puis elle est conditionnée à l'état de solution

stérile et éventuellement congelée et lyophilisée.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

5           Exemple I

On utilise comme matériau de départ 1 Kg de précipité "I+II+III" obtenu à partir de plasma traité à l'éthanol selon la méthode de Cohn (déjà cité) ou de Kistler et Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414).

10           Ce précipité est remis en suspension en tampon acétate (acétate de sodium-acide acétique) à pH 4,7-4,9, sous agitation, à 20°C.

On y ajoute de l'acide octanoïque jusqu'à une concentration finale de 20 g/l. L'addition doit être effectuée lentement, à température ambiante.

15           Le mélange est additionné d'un adjuvant de filtration et le précipité est séparé par filtration au moyen d'un filtre-presse.

Le filtrat est récupéré, clarifié et concentré par 20 ultrafiltration, puis il est soumis à une filtration stérilisante à 0,45 µm et 0,2 µm.

Il est ensuite soumis à un traitement d'inactivation virale par solvant/détergent comme décrit par Neurath et Horowitz (brevet US 4,764,369).

25           On utilise un mélange Triton® X 100 (octoxinol 10)/TnBP.

Le mélange est ajusté à 64 g/l de protéines, à pH 6,5. Le contact est maintenu pendant 4 à 6 heures, entre 4 et 25°C. Ensuite le pH est ajusté à 9 (par NaOH).

30           Le mélange est ensuite soumis à une chromatographie d'échange d'anions sur colonne.

On utilise comme matériau échangeur d'anions du TMAE-Fractogel®, chargé dans une colonne de chromatographie, équilibré en tampon glycine-NaCl (glycine 0,676 g/l - NaCl 0,526 g/l) à pH 9.

35           Le mélange est chargé sur la colonne à raison de 50 g de protéines pour 1 litre de gel.

Après la charge, la colonne est lavée en tampon glycine - NaCl, pH 9 (le même que pour l'équilibrage). Le lavage est surveillé par la densité optique de l'effluent à 280 nm.

- 5 Après retour à la ligne de base, la colonne est éluée avec du tampon phosphate à pH 6,2 (hydrogénophosphate disodique - dihydrogénophosphate de sodium).

L'éluat, contenant les immunoglobulines G, est ajusté à pH 4,5 et soumis à une ultrafiltration sur cassettes.

- 10 La solution est ensuite soumise à une filtration stérilisante à 0,22  $\mu$ m, puis à une filtration nanométrique sur trois filtres disposés en série et de seuils de rétention décroissants, de 100, 50 et 20 nanomètres. La filtration est suivie d'une ultrafiltration sur cassette
- 15 pour concentrer la solution finale à 120-150 g/l.

Les résultats d'analyse de trois lots pilotes sont présentés dans le tableau suivant.

20 Tableau I. : LOTS PILOTES

	00 ILP 043 PV	00 ILP 044 PV	00 ILP 045 PV
Polymères (%)	0.19	0.19	0.07
Dimères (%)	3.29	2.27	2.15
Monomères (%)	96.52	97.54	97.78
IgG (g/l)	52.5	50.4	50.8
IgG1 (g/l)	31.6	29.9	29.2
IgG2 (g/l)	17.1	15.3	13.1
IgG3 (g/l)	1.19	1.07	0.96
IgG4 (g/l)	0.52	0.61	0.56
IgM ( $\mu$ g/l)	310	459	1795
Anti-Hbs (UI/ml)	10.2	10.3	9.4

#### Exemple II

- On utilise comme matériau de départ 1670 g de
- 25 "précipité II" obtenu à partir de 80 litres de plasma traité

à l'éthanol selon la méthode de Cohn.

Cette variante du procédé permet notamment de tirer parti de précipités II congelés et stockés en attente de traitement.

5 Ce précipité est remis en suspension dans 9 kg d'eau-NaCl. Le pH est ajusté à 6,2 par de l'acide acétique.

On y ajoute, comme adsorbant (des contaminants de type lipidiques, kallikréine...), 15 g de phosphate tricalcique.

Après une heure de contact, le mélange est additionné  
10 d'un adjuvant de filtration et le précipité est séparé par filtration au moyen d'un filtre-presse.

Le filtrat est récupéré, est additionné de glycine (15 g/l) et ajusté à pH 4,8 par de l'acide acétique.

On y ajoute, comme adsorbant (notamment des traces de  
15 facteurs de coagulation activés) 80 g de bentonite, sous agitation pendant 30 minutes.

Le mélange est additionné d'un adjuvant de filtration et le précipité est séparé par filtration au moyen d'un filtre-presse.

20 Le filtrat est récupéré, concentré par ultrafiltration.

Le procédé est poursuivi (par traitement au solvant/détergent et chromatographie) comme dans l'exemple I.

25 Les résultats d'analyse de trois lots pilotes sont présentés dans le tableau suivant.



Tableau II : LOTS PILOTES.

	286	287	321
Polymères (%)	0,5	0,5	< 0,1
Dimères (%)	2,8	2,8	1,4
Monomères (%)	96,7	96,7	98,5
IgG (g/l)	51,8	53,2	61,3
IgG1 (%)	62,5	62,6	64,4
IgG2 (%)	33,0	33,0	32,2
IgG3 (%)	3,2	3,3	2,2
IgG4 (%)	1,2	1,2	0,8
IgA (mg/l)	26,4	21,5	12,6
IgM (µg/l)	90,8	69,4	123
anti-Hbs			
(UI/ml)	147	122	8,6

Exemple III

5 Le procédé est mis en oeuvre de la même manière que dans l'exemple I mais le matériau de départ est du plasma (non précipité à l'éthanol).

Cette variante n'est pas avantageuse au point de vue du rendement mais elle présente un intérêt (par son nombre  
10 réduit d'étapes) pour le traitement de plasmas particulièrement riches en anticorps rares.

Exemple IV

15 Le procédé est mis en oeuvre de la même manière que dans l'exemple I mais la chromatographie est éluée de manière séquentielle :

après la charge et le lavage de la colonne, celle-ci est éluée avec un premier tampon phosphate à pH 6,2 pour éluer les IgG comme dans l'exemple I ;

20 ensuite elle est éluée avec le même tampon additionné de NaCl 150 mM, qui élue une fraction enrichie en IgA et en IgG4 ;

Les IgG4 semblent jouer un rôle dans la protection

contre les infections parasitaires et contre les allergies aux pollens et aux acariens.

De manière surprenante leurs propriétés biochimiques et leur comportement en échange d'ions les apparentent aux  
5 IgA.

#### Exemple V

Le procédé est mis en oeuvre de la même manière que dans l'exemple IV mais après la deuxième élution qui produit  
10 la fraction enrichie en IgA, le même tampon est additionné de NaCl 300 mM ce qui décroche les IgM. On obtient ainsi une fraction concentrée (à 80 %) d'IgM. Celles-ci sont concentrées et additionnées de stabilisants pharmaceutiquement acceptables.

15 Les résultats de production d'un lot d'IgM concentrées sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau III

(Lot IgM 2000-97)						
Fraction	Volume (ml)	Ig Totales (mg)	IgM (mg)	IgG (%)	IgA (%)	IgM (%)
Ig prépurifiées	2190	39957	2037	92.6	2,2	5.1
Fraction non retenue sur la colonne	3800	566,8	<32.3	86.5	<7.8	<5.7
Eluat 1 (IgG)	2700	37374	<22.9	99.8	<0.1	<0.1
Eluat 2 (IgA) (0.15M NaCl)	1350	3171	62.5	74.9	23.1	2
Eluat 3 (IgM) (0.3M NaCl)	114.5	1775.1	1545.7	6.2	6.8	87.1

**REVENDICATIONS**

1.- Procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique à partir de plasma sanguin ou d'une fraction de plasma enrichie en immunoglobulines, caractérisé en ce qu'il comprend une  
5 prépurification par précipitation de contaminants lipidiques et protéiques et une chromatographie unique sur échangeur d'anions, effectuée à pH alcalin ce qui permet l'adsorption des immunoglobulines sur le support chromatographique  
10 échangeur d'anions.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la prépurification est effectuée au moyen d'agents précipitants connus, tels que l'acide octanoïque, le phosphate tricalcique, la bentonite.

15 3.- Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il comporte, après la prépurification et avant la chromatographie, un traitement d'inactivation virale, de préférence par solvant-détergent.

20 4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la chromatographie est effectuée sur un gel de polysaccharide réticulé ou de polymère vinylique, greffé de groupements DEAE ou TMAE ou QAE.

25 5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la chromatographie comprend - l'utilisation de la solution ayant subi le traitement au solvant-détergent ;

- son ajustement à un pH de 8,9 à 9,1 ;  
- sa charge sur la colonne de chromatographie préalablement équilibrée en tampon à pH 8,9 à 9,1 ce qui permet  
30 l'adsorption des immunoglobulines et le passage des protéines non adsorbées dans l'effluent ;  
- un lavage par le même tampon jusqu'à élimination de toutes les protéines non adsorbées et du mélange solvant-détergent ;

35 - et l'élution des immunoglobulines par un tampon approprié.

6.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce

que l'élution est réalisée en une étape, par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, et de préférence à pH 6,2, pour éluer les immunoglobulines G.

- 7.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'élution est réalisée de manière séquentielle,
- dans un premier temps, par du tampon phosphate à pH compris entre 4 et 7, et de préférence à pH 6,2, pour éluer les immunoglobulines G ;
  - dans un deuxième temps, par le même tampon phosphate additionné de NaCl 100 à 175 mM, et de préférence 150 mM, à un pH de 6 à 6,3, pour éluer une fraction contenant les IgA et des IgG4 .

- 8.- Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, une élution par le même tampon ajusté à un pH de 6 à 7 et additionné de NaCl 250 à 350 mM, de préférence 300 mM pour éluer les IgM.

- 9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que, après l'élution des immunoglobulines, celles-ci sont récoltées, concentrées par ultrafiltration et soumises à une filtration stérilisante conventionnelle puis à une filtration au travers de filtres nanométriques de porosité décroissante de 100 à 15 nanomètres.

- 10.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la solution d'immunoglobulines concentrée et filtrée est additionnée d'un stabilisant pharmaceutiquement acceptable puis elle est conditionnée à l'état de solution stérile et éventuellement congelée et lyophilisée.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.

PCT/FR 02/01407

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/06 C07K1/18 C07K1/36 C07K1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 075 425 A (KOTITSCHKE RONALD ET AL) 24 December 1991 (1991-12-24) claims 1-7	1,2,4,5, 9,10
Y	---	3
Y	US 6 069 236 A (BONNEEL PATRICK ET AL) 30 May 2000 (2000-05-30) claims 1-9	3
X	US 4 305 870 A (LIU DANIEL T H ET AL) 15 December 1981 (1981-12-15) claims 1-6	1,2,4,5, 9
A	US 5 808 000 A (EIBL MARTHA ET AL) 15 September 1998 (1998-09-15) claims 1-30	7

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2002

Date of mailing of the international search report

09/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01407

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5075425	A	24-12-1991	DE 3927112 C1 AT 120963 T DE 59008883 D1 EP 0413187 A1 ES 2070960 T3 JP 2044089 C JP 3083932 A JP 7068144 B	25-10-1990 15-04-1995 18-05-1995 20-02-1991 16-06-1995 09-04-1996 09-04-1991 26-07-1995
US 6069236	A	30-05-2000	FR 2706466 A1 AT 193020 T AU 7002394 A BR 9406814 A CA 2165203 A1 CZ 9503287 A3 DE 69424545 D1 DE 69424545 T2 DK 703922 T3 EP 0703922 A1 ES 2148332 T3 WO 9429334 A1 GR 3034177 T3 HU 74272 A2 JP 9500369 T PT 703922 T	23-12-1994 15-06-2000 03-01-1995 30-05-2000 22-12-1994 17-07-1996 21-06-2000 18-01-2001 13-11-2000 03-04-1996 16-10-2000 22-12-1994 30-11-2000 28-11-1996 14-01-1997 30-11-2000
US 4305870	A	15-12-1981	NONE	
US 5808000	A	15-09-1998	DE 4424935 C1 AT 406265 B AT 118995 A AT 206718 T CA 2153858 A1 DE 59509679 D1 DK 692491 T3 EP 0692491 A1 ES 2165884 T3 JP 2955211 B2 JP 8059699 A	21-03-1996 27-03-2000 15-08-1999 15-10-2001 15-01-1996 15-11-2001 03-12-2001 17-01-1996 01-04-2002 04-10-1999 05-03-1996

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date de l'Internationale No

PCT/FR 02/01407

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C07K16/06 C07K1/18 C07K1/36 C07K1/30		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 075 425 A (KOTITSCHKE RONALD ET AL) 24 décembre 1991 (1991-12-24) revendications 1-7	1, 2, 4, 5, 9, 10
Y	---	3
Y	US 6 069 236 A (BONNEEL PATRICK ET AL) 30 mai 2000 (2000-05-30) revendications 1-9	3
X	US 4 305 870 A (LIU DANIEL T H ET AL) 15 décembre 1981 (1981-12-15) revendications 1-6	1, 2, 4, 5, 9
A	US 5 808 000 A (EIBL MARTHA ET AL) 15 septembre 1998 (1998-09-15) revendications 1-30	7
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
1 août 2002		09/08/2002
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Le Flao, K

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D - de Internationale No

PCT/FR 02/01407

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5075425	A	24-12-1991	DE 3927112 C1	25-10-1990
			AT 120963 T	15-04-1995
			DE 59008883 D1	18-05-1995
			EP 0413187 A1	20-02-1991
			ES 2070960 T3	16-06-1995
			JP 2044089 C	09-04-1996
			JP 3083932 A	09-04-1991
			JP 7068144 B	26-07-1995
US 6069236	A	30-05-2000	FR 2706466 A1	23-12-1994
			AT 193020 T	15-06-2000
			AU 7002394 A	03-01-1995
			BR 9406814 A	30-05-2000
			CA 2165203 A1	22-12-1994
			CZ 9503287 A3	17-07-1996
			DE 69424545 D1	21-06-2000
			DE 69424545 T2	18-01-2001
			DK 703922 T3	13-11-2000
			EP 0703922 A1	03-04-1996
			ES 2148332 T3	16-10-2000
			WO 9429334 A1	22-12-1994
			GR 3034177 T3	30-11-2000
			HU 74272 A2	28-11-1996
			JP 9500369 T	14-01-1997
			PT 703922 T	30-11-2000
US 4305870	A	15-12-1981	AUCUN	
US 5808000	A	15-09-1998	DE 4424935 C1	21-03-1996
			AT 406265 B	27-03-2000
			AT 118995 A	15-08-1999
			AT 206718 T	15-10-2001
			CA 2153858 A1	15-01-1996
			DE 59509679 D1	15-11-2001
			DK 692491 T3	03-12-2001
			EP 0692491 A1	17-01-1996
			ES 2165884 T3	01-04-2002
			JP 2955211 B2	04-10-1999
			JP 8059699 A	05-03-1996